

## *Brevibacterium ammoniagenes*의 30S 리보솜 단백질 S1을 코드하는 유전자의 염기서열

윤기홍\* · 이미성 · 오영필 · 최정호  
우송대학교 식품생명공학부

**Nucleotide Sequence of the Putative Gene Encoding 30S Ribosomal Protein S1 from *Brevibacterium ammoniagenes*.** Yoon, Ki-Hong\*, Mi-Sung Lee, Young Phil Oh, and Jung Ho Choi. School of Food Biotechnology, Woosong University, San 7-6, Jayang-dong, Dong-ku, Taejon 300-100, Korea - The nucleotide sequence of approximately 2.4 kb immediately adjacent to *ptsG* gene coding for the glucose permease of *Brevibacterium ammoniagenes* was determined. A putative open reading frame (ORF) of 1,467 nucleotides encoding a polypeptide of 489 amino acid residues and a TAA stop codon was identified. The deduced amino acid sequence of the ORF product has a high homology with the 30S ribosomal protein S1 of *Mycobacterium tuberculosis* (83%), *M. leprae* (74%), *Streptomyces coelicola* (77%), and *Escherichia coli* (40%), suggesting that the predicted product of ORF is a ribosomal protein S1. The ORF is located at a distance of 266 nucleotides upstream from *ptsG* gene with a same translational direction.

**Key words:** *Brevibacterium ammoniagenes*, ribosomal protein S1, gene, nucleotide sequence

*Brevibacterium ammoniagenes*는 조미성 핵산물질을 생산하는 산업균주로 사용되고 있으며, 아미노산의 생산균주로 사용되는 *B. flavum*, *B. lactofermentum*, *Corynebacterium glutamicum*과 함께 코리네형 그람양성균이다. *B. ammoniagenes*는 발효산물로 xanthosine 5'-monophosphate (5'-XMP)를 생산하며 이것은 5'-XMP aminase를 이용한 효소적 공정으로 조미효과가 높은 guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP)로 변환될 수 있는데 [9], *B. ammoniagenes* 세포의 ATP가 이용된다[8].

*B. ammoniagenes*, *B. lactofermentum*와 *B. flavum*은 모두 *Corynebacterium* 속으로 재분류되어 명명되기도 하는데 실제 *B. lactofermentum*, *B. flavum*와 *C. glutamicum*의 3 균주간에는 유전적 유사성이 매우 높아 모두 *C. glutamicum*에 속한다고 보고되기도 하였으나 [16], *B. ammoniagenes*는 이들과 유전자 유사성이 직접 비교되지는 않았다. 최근에 당 전달계의 구성효소인 glucose permease를 코드하는 유전자가 *C. glutamicum*[14,15], *B. lactofermentum*과 [20] *B. ammoniagenes*[21]로부터 각각 크로닝되어 그 염기서열이 밝혀짐으로써 이들 균주에서 동일한 기능을 하는 유전자간에 상동성이 조사되었다. Glucose permease의 아미노산 잔기배열을 비교하였을 때 *B. lactofermentum*과 *C. glutamicum*간에는 90% 이상의 높은 상동성을 보였으나 *B. ammoniagenes*의 것은 다른 두 균주와 상동성이 약 45%인

것으로 보고되었다.

현재 인간을 비롯한 많은 생물체의 유전체에 대한 분석이 매우 활발히 진행되고 있으며 미생물에서는 이미 *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*를 비롯하여 다수의 병원성 미생물들의 유전체 염기서열이 결정되었다. 아미노산 발효균이나 핵산 발효균에서는 발효산물의 생산에 직접적으로 관련된 효소의 유전자를 중심으로 다수의 유전자가 크로닝되어 그 염기서열이 밝혀졌으며, *B. lactofermentum*, *B. linens*와 *C. glutamicum*염색체를 제한효소로 절단함으로써 그 크기가 약 3,000 kb 정도이고 절단형태는 다른 것으로 확인되었다[5]. 또한 *C. glutamicum* 유전체의 제한효소지도와 유전자지도가 완성되었다 [2].

본 연구에서는 *B. ammoniagenes* 총 염색체 DNA의 cosmid library를 만들어 염색체상에서 glucose permease 유전자의 주변에 어떠한 유전자가 존재하는가를 분석한 결과 30S 리보솜 단백질 중 S1을 코드하는 것으로 추정되는 유전자가 발견되어 그 염기서열을 결정하고 이로부터 추론되는 단백질의 아미노산 배열을 다른 미생물의 것과 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 미생물 균주와 플라스미드 및 배지

*B. ammoniagenes* ATCC 6872는 유전자 제공원으로 사용되었고 유전자조작을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac-proAB) F[traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>f</sup> lacZAM15]*)와 *E. coli* XL-1 blue (*hsdR17 supE44 recA1 endA1 gyrA46 relA1 thi lac*

\*Corresponding author

Tel. 042-630-9742, Fax. 042-636-2676

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

F[*proAB*<sup>+</sup> *lacA*<sup>+</sup> *lacZ*AM15::Tn10 (*tet*<sup>r</sup>)]가 각각 사용되었다. Cosmid SuperCos 1은 Stratagene 회사로부터 구입하였으며 *B. ammoniagenes* 염색체의 분자량이 큰 DNA 절편을 도입하여 유전자 은행을 제조하기 위한 유전자 운반체로 사용되었고, 플라스미드 pUC19는 subcloning을 위한 유전자 운반체로 사용되었다. *B. ammoniagenes*와 *E. coli*의 배양을 위해서는 LB 배지 (5 g yeast extract, 10 g bacto-tryptone, 5 g NaCl per liter)가 사용되었고 *E. coli*의 형질전환시 SOB 배지 (2% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>), MacConkey 배지 등이 사용되었으며 형질전환주를 선별하기 위해서는 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 평판배지가 사용되었다.

### DNA 분리과 조작

*B. ammoniagenes*로부터 총 염색체 DNA를 다음과 같이 분리하였다. Glycine을 1%가 되도록 첨가한 LB 액체배지에서 *B. ammoniagenes*를 대수기까지 배양한 후 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 이를 SET 용액 (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0)으로 세척하고 lysozyme을 첨가한 TEN 용액 (0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 M Tris·Cl, pH 9.0)에 현탁시킨다. 이를 37°C에서 30분간 방치하고 SDS 용액을 1%가 되도록 첨가하여 용균시킨 후 protease K를 첨가하고 1시간동안 37°C에서 방치하였다. Phenol을 처리한 후 원심분리하여 상등액을 취해 -20°C에서 방치한 에탄올을 2배 부피로 첨가하여 유리봉으로 염색체 DNA를 잡아올렸다. 이를 TE 용액 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹이고 RNase A를 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 처리한 후 다시 phenol로 처리하여 앞의 과정을 되풀이하여 최종적으로 순수한 *B. ammoniagenes*의 총 염색체 DNA를 얻었다. *E. coli*로부터 플라스미드 DNA를 분리하기 위해서는 Birnboim과 Doly 방법과 [3] Qiaprep kit (Qiagen)를 이용하였다. 재조합 플라스미드의 제조시 *E. coli* JM109의 형질전환은 Hanahan 방법에 의해 실시하였다[12].

### *B. ammoniagenes*의 유전자 은행제조

*B. ammoniagenes* 염색체 DNA를 *Sau3AI*으로 부분 절단한 후 10%~40% 범위로 농도구배된 sucrose 용액위에 조심스럽게 중층하여 25,000 rpm으로 18시간 동안 원심분리함으로써 30 kb 이상의 DNA 조각을 분획하였다. 이를 *BamHI*으로 절단하여 탈 인산화 시킨 Stratagene의 SuperCos 1과 T4 DNA ligase로 ligation 시킨 후 Stratagene 회사에서 권고한 사용법에 따라 *in vitro* packaging하여 *E. coli* XL-1 blue 균주에 도입함으로써 유전자 은행을 제조하였다.

### DNA 염기서열의 결정과 분석

염기서열을 결정할 *B. ammoniagenes* 염색체 부분을 제한효소로 작게 절단하여 이들을 pUC19에 도입함으로써 재

조합 플라스미드를 제조하였다. 이때 염기서열을 결정할 부위가 중복되어 판독될 수 있도록 재조합 플라스미드를 제조하였으며 염기서열은 재조합 플라스미드를 template DNA로 하고 universal primer와 reverse primer를 사용하여 dideoxy-chain termination 방법을[19] 이용하여 Automatic DNA sequencer (ABI, model 373A, version 2.0.1S)로 결정하였다. DNA의 염기서열과 단백질의 아미노산 배열은 DNASIS (Hitachi Software Engineering, Japan) program을 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

Glucose permease 유전자를 갖는 재조합 cosmid의 선별 제한효소 *Sau3AI*으로 부분 절단된 *B. ammoniagenes* DNA 단편 중 크기가 30 kb 이상의 것들을 *BamHI*으로 절단된 SuperCos 1과 ligation하고 이를 *E. coli*에 도입함으로써 약 2,000 개의 형질전환주를 얻었으며 이들로부터 플라스미드 DNA를 분리하였다. 이들 플라스미드 중 일부를 제한효소로 처리하여 그 크기를 측정된 결과 대부분이 40 kb 정도 이상의 *B. ammoniagenes* DNA를 함유하고 있는 것으로 나타났다. *B. ammoniagenes*와 유사한 *B. lactofermentum*, *B. linens*과 *C. glutamicum*의 염색체 크기가 약 3,000 kb 정도로 예상되고 있으므로 SuperCos 1을 사용하여 제조된 *B. ammoniagenes*의 유전자 은행은 산술적으로 보았을 때 *B. ammoniagenes* 염색체 크기의 약 25배에 해당하는 DNA를 함유하는 것으로 예측되므로 *B. ammoniagenes*의 유용 유전자를 탐색하거나 유전체 염기서열을 결정하기 위해서 유용한 재료가 될 것이다.

이들로부터 *B. ammoniagenes*의 glucose permease 유전자를 함유한 재조합 cosmid를 선별하기 위해 이미 그 유전자의 염기서열이 밝혀진[21] glucose permease 유전자의 일부를 primers로 합성하여 형질전환주에서 분리된 플라스미드 DNA를 template DNA로 하여 PCR 반응을 수행한 후 그 산물을 조사한 결과 약 300 개 중에서 1 개로부터 glucose permease 유전자에 해당하는 PCR 산물이 얻어졌다 (data not shown). 이 재조합 플라스미드를 Cos13-27이라고 명명하고 여러종류의 제한효소로 처리하여 그 크기를 측정된 결과 약 50 kb 정도의 *B. ammoniagenes* 염색체를 가지고 있었으며 glucose permease 유전자도 포함하고 있는 것으로 확인되었다.

*B. subtilis*와 *E. coli*에서 glucose가 세포내로 전달될 때 phosphotransferase system이 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이때 glucose의 전달에 관여하는 효소계를 코드하는 유전자는 염색체상에서 한 위치에 모여 *ptsG* 오페론 구조를 이루고 있는데, *B. subtilis*는 *ptsG-ptsH-ptsI*[10, 22]. *E. coli*는 *ptsH-ptsI-crr*[6]로 *ptsG* 오페론의 구성유전자가 배열되어 있다. 그러므로 *B. ammoniagenes*의 glucose

permease를 코드하는 *ptsG* 유전자와 인접한 부위의 유전자를 조사하기 위해 이를 포함하는 재조합 플라스미드 Cos13-27를 분석하였다. 플라스미드 Cos13-27에 존재하는 *B. ammoniagenes* DNA의 크기가 크므로 우선적으로 glucose permease 유전자 주변을 분석하기 위해 Cos13-27을 *EcoRI*으로 절단하여 agarose gel에서 전기영동한 후 크기가 각기 다른 9 개 DNA 조각을 추출하여 *EcoRI*으로 절단한 pUC19에 각각 도입함으로써 재조합 플라스미드를 제조하였다. 플라스미드 pUC19에 삽입된 DNA 조각의 양쪽 말단의 염기서열을 결정하여 *ptsG* 유전자의 염기서열과 비교한 결과 5.4 kb와 1.4 kb의 *EcoRI* 절단 DNA 조각을 지닌 2개의 재조합 플라스미드가 각각 *ptsG* 유전자 지역을 포함하고 있는 것으로 확인되어 이들을 각각 pC13E31과 pC13E75로 명명하였다. 그런데 pC13E75에 존재하는 1.4 kb의 *EcoRI* 절단 DNA 조각은 이미 *ptsG* 유전자의 염기서열로 보고된 부분에 해당하며[21] 5.4 kb는 이미 보고된 *ptsG* 유전자의 일부와 함께 주변 염색체 DNA를 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 그리하여 Fig. 1에서 나타낸 것과 같이 제한효소 지도를 작성하고 염기서열을 결정하기 위해 여러 가지 제한효소를 사용하여 pUC19에 subcloning을 하고 그 염기서열을 결정하였다. 이때 pC13E31에 존재하는 *B. ammoniagenes* insert DNA는 *ptsG* 유전자와 가까운 부분부터 그 염기서열을 결정하였다.

30S 리보솜 단백질 S1로 추론되는 유전자의 염기서열

*ptsG* 유전자 위 부분에 해당하는 *B. ammoniagenes* 염색체 DNA의 염기서열로부터 단백질을 코드할 가능성이 있는 ORF를 조사한 결과 염기서열 위치 636~2,102 지점에서 1,467 bp 크기의 *orf1*이 발견되었다 (Fig. 2). 489개 아미노산을 갖는 polypeptide를 코드하는 것으로 추론되는 *orf1* 유전자는 개시코돈 ATG와 종결코돈으로 TAA를 지니고 있으며 염색체상에서 *ptsG* 유전자와 동일한 방향으로 전

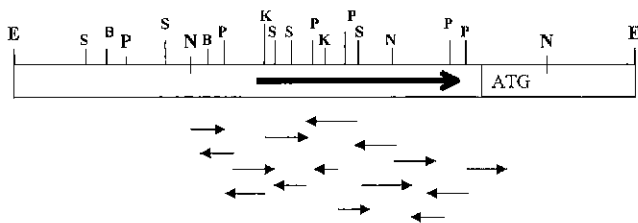


Fig. 1. Restriction endonuclease map and nucleotide sequencing strategy of *B. ammoniagenes* chromosomal DNA.

The restriction sites for enzymes was illustrated on the 5.4-kb *EcoRI* fragment of plasmid pC13E31. The restriction site abbreviations are as follows: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sa*I. The bold line denotes the 1,467-nucleotides gene encoding 30S ribosomal protein S1 and with the arrow indicating the direction of the transcription. ATG is corresponding to the start codons of *ptsG* gene. Arrows indicate individual subclones isolated in pUC19 and extent of DNA sequence established for each.

사되도록 배열하고 있고 glucose permease 구조유전자의 위 지역에 존재하는 것으로 확인되었다. 그리고 *orf1* 유전자와 *ptsG* 유전자간에는 266 bp가 떨어져 있다. 또한 *orf1*의 개시코돈에서 위쪽으로 11 nucleotides 떨어진 염기서열 위치 621~624 지점에서 리보솜 결합부위로 예상되는 퓨린 염기가 많은 염기서열이 발견되었는데 이는 일반적으로 리보솜 결합부위가 구조유전자의 개시코돈에서 6~7 nucleotides가 떨어진 곳에 존재하고 있다는 사실에 비하면 멀리 떨어져 있음을 알 수 있다. 한편 종결코돈 뒤쪽에서는 rho-비의 존적인 전사종결을 일으키도록 회문형 구조를 이룰수 있는 염기서열이 발견되지 않았으며 glucose permease 유전자 개시코돈 사이인 염기서열 위치 2106~2371 지점에는 A와 T 염기가 많이 존재하였다.

Fig. 2에서 보인바와 같이 *orf1*의 염기배열로부터 추론되는 단백질의 아미노산 배열을 BLAST 조사 프로그램을 사용하여[1] NCBI database에 있는 기존에 알려진 단백질 및 유전자산물의 것과 비교한 결과 30S ribosome protein S1과 유사성을 보였으며, 특히 *Mycobacterium tuberculosis* [4], *M. leprae*와[7] *Streptomyces coelicola*[17]의 것과는 높은 유사도를 나타냈다. 따라서 ORF1 유전자산물이 30S 리보솜 단백질 S1의 기능을 보이는지 실험적으로 증명되지는 않았지만 S1 단백질로 예상된다. 한편 그 결과는 나타내지 않았지만 *orf1*과 그 위쪽 지역의 *B. ammoniagenes* DNA의 염기서열이 *M. tuberculosis*와 *M. leprae*의 염색체 염기서열과 상동성이 높은 것으로 나타났는데, 이들 균이 분류상으로 유사하지만 핵산발효균의 유전자 염기서열이 부분적으로나마 병원성균인 이들 균주와 유사성이 높다는 것은 매우 흥미롭다고 할 수 있다. 그러나 리보솜 단백질 S1 유전자 지역외에는 *S. coelicola* 염색체 DNA의 염기서열에서 상동성이 높은 지역이 발견되지는 않았다.

리보솜 단백질 S1의 아미노산 배열 비교

원핵세포의 리보솜 단백질 중 S1은 그 크기가 가장 크며 30S 리보솜과 상호작용하는 부위와[11] 더불어 RNA 결합 부위를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며[18], mRNA로부터 단백질이 합성되는 판독과정에서 그 효율이 주로 리보솜 결합에 의해 좌우되지만 S1도 Shine-Dalgarno 서열 위 부분에 존재하는 피리미딘 염기서열과 작용함으로써 판독의 개시코돈의 효율을 증진시키는 것으로 보고되었다 [13].

*orf1* 유전자의 염기서열로부터 유추된 *B. ammoniagenes*의 리보솜 단백질 S1의 아미노산 잔기 배열은 주로 세균의 리보솜 단백질 S1과 유사성을 보이는데 그 중에서 *M. tuberculosis*의 S1과 83%로 가장 높은 상동성을 보였으며 *M. leprae*와 *S. coelicola*의 S1과도 각각 74%와 77%의 높은 상동성을 보였다 (Fig. 3). 특히 아미노 말단에서 359 번째 아미노산 지역은 단백질간에 상동성이 더 높음으로 나타났다. 또한 *B. ammoniagenes*의 S1 단백질이 489



- Nature* **393**: 537–544.
5. Correia, A., J. F. Martin, and J. M. Castro. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. *Microbiology* **140**: 2841–2847.
  6. De Reuse, H. and A. Danchin. 1988. The *ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. *J. Bacteriol.* **170**: 3827–3837.
  7. Fsihi, H. and S. T. Cole. 1995. The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *polA* locus associated with genomic variability. *Mol. Microbiol.* **16**: 909–919.
  8. Fujio, T. and A. Furuya. 1983. Production of ATP from adenine by *Brevibacterium (Corynebacterium) ammoniagenes*. *J. Ferment. Technol.* **61**: 261–267.
  9. Fujio, T., T. Nishi, S. Ito, and A. Maruyama. 1997. High level expression of XMP aminase in *Escherichia coli* and its application for the industrial production of 5'-guanylic acid. *Biosci Biotechnol. Biochem.* **61**: 131–137.
  10. Gonzy-Treboul, G., M. Zagorec, M. -C. Rain-Guion, and M. Steinmetz. 1989. Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH*, and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. *Mol. Microbiol.* **3**: 103–112.
  11. Goss, D. J. and L. J. Parkhurst. 1983. The binding of ribosomal protein S1 to S1-depleted 30S and 70S ribosomes: a fluorescence anisotropy study of the effects of Mg<sup>2+</sup>. *Nucleic Acids Res.* **11**: 5589–5602.
  12. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
  13. Kalapo, M. P., H. Paulus, and N. Sarkar. 1997. Identification of ribosomal protein S1 as a poly(A) binding protein in *Escherichia coli*. *Biochimie* **79**: 493–502.
  14. Lee, J. K., M. H. Sung, K. H. Yoon, J. G. Pan, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1993. Cloning and expression of the gene encoding mannose enzyme II of the *Corynebacterium glutamicum* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 1–5.
  15. Lee, J. K., M. H. Sung, K. H. Yoon, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1994. Nucleotide sequence of the gene encoding the *Corynebacterium glutamicum* mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 137–146.
  16. Liebl, W., M. Ehrmann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1991. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297<sup>T</sup>, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137<sup>T</sup> to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst. Bacteriol.* **41**: 255–260.
  17. Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, and D. A. Hopwood. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77–96.
  18. Ringquist, S., T. Jones, E. E. Snyder, T. Gibson, I. Boni, and L. Gold. 1995. High-affinity RNA ligands to *Escherichia coli* ribosome and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites. *Biochem* **34**: 3640–3648.
  19. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463–5467.
  20. Yoon, K. H., K. N. Lee, J. K. Lee, and S. C. Park. 1999. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Characterization of *ptsG* Gene Encoding Glucose-specific Enzyme II of Phosphotransferase system from *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 582–588.
  21. Yoon, K. H., H. Yim, and K. H. Jung. 1998. Cloning, expression, and nucleotide sequencing of the gene encoding glucose permease of phosphotransferase system from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 214–221.
  22. Zagorec, M. and P. W. Postma. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 325–328.

(Received May 9, 2000)